

(54) ACETYLAMINOMETHYL CYCLOHEXANECARBOXYLIC ACID ESTER AMIDE HYDROLASE AND ITS PRODUCTION

(11) 5-276944 (A) (43) 26.10.1993 (19) JP
 (21) Appl. No. 4-77577 (22) 31.3.1992
 (71) TOKUYAMA SODA CO LTD (72) YUZO SUGITA(2)
 (51) Int. Cl.⁵. C12N9/80, C12P13/04 // (C12N9/80, C12R1/05, C12R1/38, C12R1/77, C12R1/72)

PURPOSE: To provide a new enzyme capable of hydrolyzing acetylaminomethylcyclohexanecarboxylic acid (carboxyethyl) phenyl ester.

CONSTITUTION: The objective enzyme reacts, in an optimum pH of 8.5-10, with acetylputrescine and hydrolyzes acetylaminomethyl cyclohexanecarboxylic acid (carboxyethyl)phenyl ester to form aminomethylcyclohexanecarboxylic acid (carboxylethyl)phenyl ester.

(54) PRODUCTION OF FORMED SILICONE MATERIAL HOLDING IMMOBILIZED PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE

(11) 5-276945 (A) (43) 26.10.1993 (19) JP
 (21) Appl. No. 4-112157 (22) 3.4.1992
 (71) UNITIKA LTD (72) YASUKI YABUSHITA(2)
 (51) Int. Cl.⁵. C12N11/08, C08G77/00, C08J7/00

PURPOSE: To obtain the subject formed material useful as a medical material, chemical reaction catalyst, chromatographic carrier, etc., by a simple method by bonding a physiologically active substance to the surface of a formed silicone material through covalent bond using a specific method.

CONSTITUTION: Functional groups are introduced on the surface of a formed material of a silicone such as polydimethylsiloxane or polymethylphenylsiloxane by plasma treatment. A physiologically active substance is bonded to the functional groups on the surface of the formed silicone material through covalent bond by using a reagent having reactive functional group (e.g. dicyclohexyl carbodiimide and glutaraldehyde). A formed silicone material useful as a cell-adhesive hybrid-type artificial material can be produced by using e.g. fibronectin or collagen as the physiologically active substance. The use of an enzyme such as amylase as the physiologically active substance gives a formed material useful as a catalyst.

(54) CREATION OF DNA

(11) 5-276946 (A) (43) 26.10.1993 (19) JP
 (21) Appl. No. 3-291964 (22) 14.10.1991
 (71) FUJITA GAKUEN(1) (72) YOSHIKAZU KUROSAWA(4)
 (51) Int. Cl.⁵. C12N15/10, C12Q1/68

PURPOSE: To obtain the objective group of plural kinds of DNA each having a mutually different base sequence by efficiently and readily introducing each of plural kinds of the objective modifications into each of the specified base sequence.

CONSTITUTION: Simultaneous production of plural DNA each having a mutually different base sequence is carried out according to PCR technique by using a primer mixture composed of plural oligonucleotide primers each having the mutually different base sequence and capable of hybridizing in the substantially same region as one or both of a pair of oligonucleotide primers for amplifying a specified nucleic acid region in the PCR method.

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-276946

(43)公開日 平成5年(1993)10月26日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/10				
C 1 2 Q 1/68	Z	8114-4B 8931-4B	C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全 11 頁)

(21)出願番号	特願平3-291964	(71)出願人	000125381 学校法人藤田学園 愛知県豊明市栄町南館12番地の 1
(22)出願日	平成 3 年(1991)10月14日	(71)出願人	000003300 東ソー株式会社 山口県新南陽市開成町4560番地
		(72)発明者	黒沢 良和 愛知県豊明市沓掛町田楽ケ窪 1-98
		(72)発明者	伊藤 渉 愛知県豊明市沓掛町田楽ケ窪 1-98
		(72)発明者	伊庭 善孝 愛知県豊明市沓掛町田楽ケ窪 1-98
		(74)代理人	弁理士 谷川 英次郎

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 DNAの作製方法

(57)【要約】

【目的】 本発明は効率的かつ簡便に特定の塩基配列に、目的とする、異なる変異を複数種導入し、目的とする、異なる塩基配列をもつDNAの複数種の集合体を得る方法を提供すること。

【構成】 PCRにより特定の核酸領域を増幅するための一対のオリゴヌクレオチドプライマーの少なくともいずれか一方として、塩基配列の異なる複数のオリゴヌクレオチドプライマーであって実質的に同一領域にハイブリダイズするプライマー混合物を用いてPCRを行ない、それによって塩基配列の異なる複数のDNAを同時に作製する方法を提供した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 PCRにより特定の核酸領域を増幅するための一対のオリゴヌクレオチドプライマーの少なくともいずれか一方として、塩基配列の異なる複数のオリゴヌクレオチドプライマーであって実質的に同一領域にハイブリダイズするプライマーの混合物を用いてPCRを行ない、それによって塩基配列の異なる複数のDNAを同時に作製する方法。

【請求項2】 増幅すべき前記核酸領域がアミノ酸配列をコードする遺伝子であり、PCRの結果、異なるアミノ酸配列をコードする複数の遺伝子が作製される請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記遺伝子が抗体遺伝子であり、PCRの結果、異なるアミノ酸配列をコードする複数の抗体遺伝子が作製される請求項2記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、DNAの作製方法に関する。さらに詳細に言うと、本発明は、PCR（ポリメラーゼチェーンリアクション法）により、異なる塩基配列を有する複数の異種DNAを同時に作製する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】DNAは化学的に合成することが可能であるが、一般に200塩基以上のDNAを化学的に合成することは経済的にも取扱的にも非現実的である。そこで従来存在するDNAと若干異なる配列をもつ200塩基以上のDNAを作製するには、従来存在するDNAに変異を導入する方法が一般的である。

【0003】特定の塩基配列の変異を導入する方法としては、目的のDNAをファージベクター等に導入し一本鎖鋳型DNAを調製し、変異を有するオリゴヌクレオチドをアニーリングさせ、酵素的にDNAを合成し、種々の方法で変異の入ったDNAを選択的に単離する方法が知られており、この原理に基づいたキットが市販されている。

【0004】しかしながら特定の塩基配列に目的とする、異なる変異を多数種（例えば1万種）導入し、目的とする、異なる塩基配列をもつDNAの多数種の集合体を得るには、上記方法は非効率的である。またこの目的のために効率的な方法は知られていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明は効率的かつ簡便に特定の塩基配列に、目的とする、異なる変異を複数種導入し、目的とする、異なる塩基配列をもつDNAの複数種の集合体を得る方法を提供しようとするものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本願発明者は、鋭意研究の結果、PCRで核酸を増幅するに際し、プライマーと

して、塩基配列の異なるプライマー混合物を用いることにより、塩基配列の異なる多数のDNAを効率的、簡便に同時に作製することができることを見出し、本発明を完成した。

【0007】すなわち、本発明は、PCRにより特定の核酸領域を増幅するための一対のオリゴヌクレオチドプライマーの少なくともいずれか一方として、塩基配列の異なる複数のオリゴヌクレオチドプライマーであって実質的に同一領域にハイブリダイズするプライマー混合物を用いてPCRを行ない、それによって塩基配列の異なる複数のDNAを同時に作製する方法を提供する。

【0008】本発明の方法により作製される、塩基配列の異なる複数のDNAとは、鋳型核酸領域のひとつあるいは複数の箇所の、ひとつあるいは複数の塩基配列が、鋳型核酸領域の配列と異なっている変異体DNAの集合体である。該集合体には鋳型核酸領域と同一の配列を有するDNAが含まれていてもよい。該集合体の個々の種類のDNAは同じ比率で混合されていることが望ましいが、目的によっては比率が偏っていても問題ない。

【0009】本発明の方法により作製される、配列の異なる複数のDNAの集合体は、一度に多数の変異体DNAの集合体を作製し、その集合体より適当な方法で目的とする変異体DNAを選択し単離するという目的のために有効に利用し得る。本方法は従来法により変異体をひとつずつ作製し評価していく方法では、求める変異体を得るために多数の変異体を作製しなければならない場合に非常に効果的である。

【0010】従って、本発明の方法は、より高機能なタンパク質やプロモーター配列、エンハンサー配列等を探索するために特に有用である。このため、本発明の方法において増幅される核酸領域は、特に限定されないが、タンパク質をコードする遺伝子やプロモーター配列又はエンハンサー配列等が好ましい。特に、後述の実施例で示したように、本発明の方法によりアミノ酸配列の変異を有する抗体を容易に種々作製することができ、抗原との結合性がより高い抗体をスクリーニングにより得ることができるので、本発明の方法は、より抗原との親和性の高い抗体のスクリーニング等に威力を発揮する。従って、本発明の方法により、抗体遺伝子を増幅するのは好ましい態様である。

【0011】本発明の方法では、PCRで目的とする核酸領域を増幅するが、その際、塩基配列の異なる複数のオリゴヌクレオチドプライマーであって実質的に同一領域にハイブリダイズする（すなわち、ハイブリダイズする領域が重複する）プライマー混合物を用いることを特徴とする。PCRにおいて使用される一対のプライマーのうち、いずれか一方が混合プライマーであれば良く、他方は単一のプライマーであっても良い。もちろん、一対のプライマーの両方ともが混合プライマーであってもよい。本発明に使用される混合プライマーとは、目的と

する変異を与えるためにデザインされた一本鎖DNAあるいはその誘導体の集合体である。該混合プライマーは、変異を与える箇所には鋳型核酸の塩基と本来塩基対を作らない塩基が含まれた一本鎖DNAを含む。例えば該混合プライマーの5'末端から15番目に対応する鋳型DNAの塩基がグアニンであると、本来塩基対を作る塩基はシトシンであるが、この位置に4通りの塩基をもつDNA変異体を作製するためには、該混合プライマーは、5'末端から15番目にアデニン、グアニン、シトシン、チミンの4種を含んだものを合成することになる。このような混合プライマーは市販されているDNA合成機を用い通常の方法で合成することができる。合成DNAは一般的には3'末端から1残基ずつ合成していくが、変異を与える箇所に相当する配列は対応する1~4種類の塩基が入るようにすればよい。この際、2~4種類の塩基を混合する比率としてはそれぞれ等量ずつ混合するのが一般的であるが、場合によっては一定の異なる比率にした方がよい場合もある。該混合プライマーの含む異なるDNAの種類については、目的の変異の組み合わせの数に規定される。例えば、4種類の塩基をもつ箇所が5箇所あるような変異体DNAの集合を作製するためには、対応する混合プライマーの種類は $4^5 = 1024$ 通りとなる。該混合プライマーの作製には目的とする変異に対応した塩基配列が入っていること以外に、作製した混合プライマーが鋳型DNAの目的の位置にアニールし、PCRのプライマーとして正しく機能しなければならない。該目的のためには混合プライマー5'端及び3'端にミスマッチを持たない配列が約10塩基以上あるのが望ましいと言えるが、これらはミスマッチの種類や数に大きく依存するので必要ならば個々の場合で検討することが好ましい。目的の変異体DNAの集合体が出来たかどうかは、作製した変異体DNAのいくつかのシーケンスを求めて統計的に処理すればよい。処理の結果、塩基の比率に偏りが発見され、それが許容できない場合には、混合プライマーの合成の段階で各塩基の材料の混合比率を変える等により対処すればよい。なお、PCRの操作自体はこの分野において周知であり、本発明においても周知の条件を採用してPCRを行なうことができる。

【0012】本発明の方法を有効に利用するには、得られた変異DNA集合体について、目的に応じたスクリーニング法が必要であるが、これは鋳型核酸あるいは鋳型核酸由来の蛋白質の性質を測定する方法等が挙げられる。例えば該鋳型DNAが既知の抗体遺伝子である場合はこれを発現ベクターに挿入し発現させ、抗原との結合性を指標に目的の性質（例えば抗原との結合性が強い）を有する変異体DNAを単離すればよい。このような発現ベクターとしては分子生物学的手法により目的遺伝子を単離するのに使われているものであるならば何でもよく、 λ gt11等が挙げられる。

【0013】

【実施例】以下本発明をさらに詳細に説明するために実施例を示すが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0014】1. 抗リゾチーム抗体V_H鎖cDNAの単離

抗リゾチーム抗体産生ハイブリドーマHyb.C1 (T. Kobayashiら, Mol. Immunol. 19, p619~, 1982) から通常の方法で高分子DNAを調製し、 λ wes (P. Leaderら, Science 196, p175~, 1977) を用いてジェノミクライブラリーを作製した。これをマウスJ_Hプロンプを用いて通常の方法でスクリーニングを行い、V_H遺伝子を単離し、その塩基配列を決定した(図1)。

【0015】このV_H遺伝子 0.03 pmol/ml を鋳型に用い、プライマーVHXh_o及びVHEc_oEND(ともに配列は図1)をそれぞれ1 nmol/ml、dNTP 200 nmol/ml、Taq ポリメラーゼ 25 unit/ml 存在下でPCRを行い、増幅されたDNAをプラスミドタイプの λ Immunolo ZaphHのXhoI-EcoRIサイトにリクローニングし、pLeHHybVHを作製した。続いてプライマーpe1BEc_o(配列は図1)及びプライマーVHEc_oENDを用いて、pLeHHybVHを鋳型にして上記と同じ条件でPCRを行い、増幅されたDNAフラグメントを以下の実験の鋳型として用いた。

【0016】2. 混合プライマーの作製

DNA合成機(アプライドバイオシステム社、381A)を用い通常の方法でプライマー4種、LyHX40、LyHN24、LyHNII40、LyHS46を合成した。各種プライマーの配列は図2に示す。なお、図2の配列中、括弧内の塩基は変異している塩基を示す。例えば、Tの直後に(C)とある部分は、TがCに変異しているものが混合されていることを示す。また、例えば、Cの直後に(GA)とある部分は、CがGに変異したもの及びCがAに変異したものが混合されていることを示す。プライマーは合成後、アンモニアを用いる通常の方法で樹脂から切り出し、55℃で一晩保温し、オリゴヌクレオチド精製カートリッジ(アプライドバイオシステム社)により精製した。

【0017】3. 抗体V_H遺伝子への変異の導入(1)

プライマーLyHX40及びLyHN24をそれぞれ1.2 nmol/ml、dNTP 200nmol/ml、ポリメラーゼ 32 unit/ml 存在下で鋳型DNAを0.03 pmol/ml 加え、サーマルサイクラー(宝酒造)を用いてPCRで遺伝子を増幅した。なお、PCRは、10mM Tris-HCl(pH8.4)、50 mM KCl、2.5 mM MgCl₂、ゼラチン200 μ g/ml及びdNTP 200 μ Mから成る反応液を用い、94℃で1分間、55℃で2分間、72℃で1.5分間の温度条件で行なった。83塩基対のDNAが増幅されたことは電気泳動で確かめられた。次に増幅されたDNAを制限酵素XhoIとNheIで切断し、プラスミドBlue Script II(東洋紡)に

NheIサイトを導入したものに挿入し、インサートDNAが入ったクローン20種の変異導入部位の塩基配列を通常の方法で決定した。図4及び図5にその結果を示した。変異を導入する塩基は6箇所ある。変異導入箇所でも5'側にあるTのTとCへの変換についてはTが85%に対しCが15%であるように偏りが見られたが、その他の箇所の変異については例えば次のAをTとAに変換することについてはTが60%に対しAが40%というように良好な結果を示した。またアミノ酸レベルでも、F(フェニルアラニン)とL(ロイシン)をコードするDNAの比率がそれぞれ85%と15%であるように偏りが見られたが、その他の箇所の変異については例えばS(セリン)とT(トレオニン)をコードするDNAの比率がそれぞれ60%と40%であるように良好な結果を示した。

【0018】4. 抗体V_H遺伝子への変異の導入(2)
プライマーLyHNII40及びLyHS46をそれぞれ1.5 pmol/ml、dNTP 200 nmol/ml、ポリメラーゼ 32 unit/ml 存在下で鋳型DNAを0.03 pmol/ml 加え、PCR(宝酒造)で遺伝子を増幅した。なお、PCRは上記3と同様に行なった。183塩基対のDNAが増幅されたことは電気泳動で確かめられた。次に増幅されたDNAを制限酵素SpeIとNheIで切断し、プラスミドBlue Script II(東洋紡)にNheIサイトを導入したものに挿入し、インサートDNAが入ったクローン13種の変異導入部位の塩基配列を通常の方法で決定した。図6及び図7にその結果を示した。変異を導入する塩基は13箇所ある。変異導入箇所でも5'側から5番目にあるGのGとAへの変換についてはGが85%に対しAが15%であるように偏りが見られたが、その他の箇所の変異については例えば変異導入箇所でも5'側にあるGのGとAに変換することについてはGが54%に対しAが46%というように良好な結果を示した。またアミノ酸レベルでも、D(アスパラギン酸)とN(アスパラギン)をコードするDNAの比率がそれぞれ85%と15%であるように偏りが見られたが、その他の箇所の変異については良好な結果を示した。

【0019】

【発明の効果】本発明で提供される、特定の塩基配列に目的とする、異なる変異を多数導入し、目的とする、異なる塩基配列をもつDNAの多数の変異体の集合を得る方法を用いることにより、多数のDNA配列、ひいては*

*多数の変異タンパク質、多数のプロモーターやエンハンサー等を同時に作製し、その中で優れた効果を発揮するものをスクリーニングすることができる。従って、本発明により、従来法では単離することの極めて困難な高機能なDNAを単離することが可能になる。これらは従来法では取得することが極めて困難な高機能な蛋白質の作製、蛋白質の活性部位の研究、高機能なプロモーターやエンハンサーDNAの作製等に有用である。

【図面の簡単な説明】

10 【図1】実施例1の方法で単離した抗リゾチーム抗体cDNAのV_H領域の配列、及び使用したプライマーの塩基配列を示す。

【図2】各種混合プライマーの塩基配列を示す。

【図3】鋳型DNAと混合プライマーを用いたPCRの概要を示す。

20 【図4】(a)プライマーLyHX40の変異導入部のコードするアミノ酸配列、(b)鋳型DNAのコードするアミノ酸配列、(c)プライマーLyHX40の変異導入部の塩基配列、(d)鋳型DNAの塩基配列、(e)プライマーLyHX40とLyHN24を用いてPCRを行って得た変異体DNA集合体中の20クローンの変異導入部位の各塩基配列を示す。

【図5】(a)プライマーLyHX40とLyHN24を用いてPCRを行って得た変異体DNAのコードし得るアミノ酸配列、(b)プライマーLyHX40とLyHN24を用いてPCRを行って得た変異体DNA集合体中の20クローンの変異導入部位のコードするアミノ酸配列。

30 【図6】(a)プライマーLyHNII40及びLyHS46の変異導入部のコードするアミノ酸配列、(b)鋳型DNAのコードするアミノ酸配列、(c)プライマーLyHNII40及びLyHS46の変異導入部の塩基配列、(d)鋳型DNAの塩基配列、(e)プライマーLyHNII40及びLyHS46を用いてPCRを行って得た変異体DNA集合体中の13クローンの変異導入部位の各塩基配列を示す。

40 【図7】(a)プライマーLyHNII40及びLyHS46を用いてPCRを行って得た変異体DNAのコードし得るアミノ酸配列、(b)プライマーLyHNII40及びLyHS46を用いてPCRを行って得た変異体DNA集合体中の13クローンの変異導入部位のコードするアミノ酸配列を示す。

【図1】

```

GAAGTGAAGCTGGTGGAGTCAGGGGGAGGCTTAATGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
CTTCACTTCGACCACCTCAGTCCCCCTCCGAATTACTTCGGACCTCCCAGGGACTTTGAG
E V K L V E S G G G L M K P G G S L K L -
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAACGATTACATGGCTTGGGTTCCGCCAGACT
61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
AGGACACGTCGGAGACCTAAGTGAAAGTCATTGCTAATGTACCGAACCCAAGCGGTCTGA
S C A A S G F T F S N D Y M A W V R Q T -
CCTGAGAAAAGGCTGGAGTGGGTGCGATCCATTAGTGGTGGTGGTGATTATATTTATTAT
121 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
GGACTCTTTTCCGACCTCACCCAGCGTAGGTAATCACCACCACCACTAATATAAATAATA
P E K R L E W V A S I S G G G D Y I Y Y -
GAAGACAATGTGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAAAACACCCTGTAC
181 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
CTTCTGTACACTTCCCCGCTAAGTGGTAGAGGTCTCTGTTACGGTTTTTGTGGGGACATG
E D N V K G R F T I S R D N A K N T L Y -
CTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCAAATATTACTGTACAAGAGAGAGG
241 -----+-----+-----+-----+-----+ 300
GACGTTTACTCGTCAGACTTCAGACTCCTGTGTGCGTTTATAATGACATGTTCTCTCTCC
L Q M S S L K S E D T A K Y Y C T R E R -
AGCTACAGTGATTACGACCTTGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACT
301 -----+-----+-----+-----+-----+ 360
TCGATGTCACATAATGCTGGAACGGACCAACGAATGACCCCGGTTCCCTGAGACCAGTGA
S Y S D Y D L A W F A Y W G Q G T L V T -
GTCTCTGCA
361 ----- 369
CAGAGACGT
V S A -

```

VHX_{ho}

5'-CTGCTCGAGTCAGGGGGAGGCTTAA-3'

VHE_{co}END

5'-GCGAATTCTAAGTCGACACAGTGAC-3'

PclBE_{co}

5'-CAGAATTCAGGAGGAATTTAAAATGAAATACCTATTG-3'

【図2】

L y H X 4 0

5'-GCCTCGAGTTTCACTT(C)TCT(A)CCA(G)A(G)CT(GA)A(T)CTACATGGCTTGGG3'

L y H N 2 4

5'-ATGCGAGCGACCCACTCCAGCCTT3'

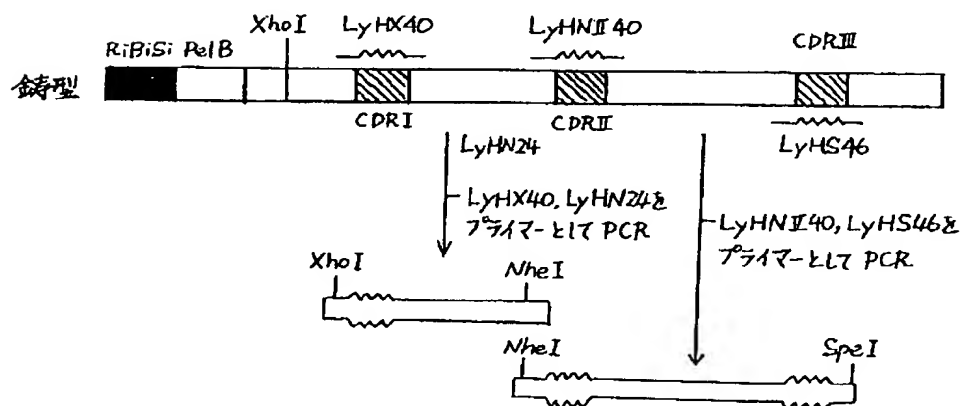
L y H N II 4 0

5'-TCGCTAGCATTAGTG(C)G(C)TGG(A)TG(A)GCG(A)ACTA(C)CAC(T)CTATTATGA3'

L y H S 4 6

5'-AGACTAGTTCGTAATCACTGTA(C)GG(T)ACC(GA)T(A)CT(C)C(G)TCTTGTACAGTAATA3'

【図3】



【図4】

(a)		I N V F		S G F		L T S N D Y		TTC TCC AAC GAC TAC C A GG AT T		M A W V R Q T P E K R L E W V A S	
(b)		Levh2		A S G F T		(c)					
(d)		Levh2		GCCTCTGGATTCACT		TTC AGT AAC GAT TAC		ATGGCTTGGTTCCCCAGACTCCTCGAUAAGGCTGGAGTGGTCCGATCC		NheI	
(e)		No.1		GCCTCGAGT		CTC TCC GGC AAC TAC		-----GCTAGC			
		No.2		GCCTCGAGT		TTC TCC GAC GTC TAC		-----GCTAGC			
		No.3		GCCTCGAGT		TTC TCC AAC GTC TAC		-----GCTAGC			
		No.4		GCCTCGAGT		TTC ACC GAC TTC TAC		-----GCTAGC			
		No.6		GCCTCGAGT		TTC ACC AGC TAC TAC		-----GCTAGC			
		No.7		GCCTCGAGT		TTC ACC GAC GTC TAC		-----GCTAGC			
		No.9		GCCTCGAGT		TTC TCC GGC TTC TAC		-----GCTAGC			
		No.10		GCCTCGAGT		TTC ACC GGC GTC TAC		-----GCTAGC			
		No.12		GCCTCGAGT		TTC TCC GGC ATC TAC		-----GCTAGC			
		No.21		GCCTCGAGT		TTC TCC GGC TAC TAC		-----GCTAGC			
		No.22		GCCTCGAGT		TTC ACC AGC AAC TAC		-----GCTAGC			
		No.23		GCCTCGAGT		TTC TCC GAC GTC TAC		-----GCTAGC			
		No.24		GCCTCGAGT		TTC TCC AGC AAC TAC		-----GCTAGC			
		No.25		GCCTCGAGT		CTC TCC AGC GTC TAC		-----GCTAGC			
		No.26		GCCTCGAGT		TTC ACC GGC TTC TAC		-----GCTAGC			
		No.27		GCCTCGAGT		CTC ACC AAC GTC TAC		-----GCTAGC			
		No.28		GCCTCGAGT		TTC TCC GGC TAC TAC		-----GCTAGC			
		No.29		GCCTCGAGT		TTC TCC GGC GAC TAC		-----GCTAGC			
		No.30		GCCTCGAGT		TTC TCC GGC TAC TAC		-----GCTAGC			
		No.31		GCCTCGAGT		TTC ACC GGC TAC TAC		-----GCTAGC			

【图 5】

	(a)	I N	S V	G F	L T	D Y	F S N D . Y	M A W V R Q T P E K R L E W V A S
No. 1	A S R ---	L S G N Y						
No. 2	A S S ---	F S D V Y						A S
No. 3	A S S ---	F S N V Y						A S
No. 4	A S S ---	F T D F Y						A S
No. 6	A S S ---	F T S . Y Y						A S
No. 7	A S S ---	F T D V Y						A S
No. 9	A S S ---	F S G F Y						A S
No. 10	A S S ---	F T G V Y						A S
No. 12	A S S ---	F S G I Y						A S
No. 21	A S S ---	F S G Y Y						A S
No. 22	A S S ---	F T S N Y						A S
No. 23	A S S ---	F S D V Y						A S
No. 24	A S S ---	F S S N Y						A S
No. 25	A S S ---	L S S V Y						A S
No. 26	A S S ---	F T G F Y						A S
No. 27	A S S ---	L T N V Y						A S
No. 28	A S S ---	F S G Y Y						A S
No. 29	A S S ---	F S G D Y						A S
No. 30	A S S ---	F S G Y Y						A S
No. 31	A S S ---	F T G Y Y						A S

【図6】

																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						</
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

SpeI

NheI

【図7】

(a)										L S									
R										R W									
P										Q M									
A D S N S T										G T Y D									
Lehvh2 ASIS G G G D Y I										E R S Y S									
										EDTAKYYCTR									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
										S									
</																			

フロントページの続き

(72)発明者 保川 清
神奈川県相模原市相模大野 7－37－17

(72)発明者 山田 正幸
神奈川県相模原市若松 6－1－27